1 月 January
2020, 63(1): 36 – 45
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.01.005

亚致死浓度溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨生长繁殖和解毒酶的影响

杨娟生[#], 丛　林[#], 王翠伦, 侯栋元, 周浩楠, 于士将, 成禄艳,
雷　双, 傅云梅, 程明明, 冉　春[*]

(西南大学柑桔研究所, 重庆 400712)

摘要:【目的】害虫综合治理中,化学防治对天敌资源也具有一定的杀伤力。为缓解这一矛盾,本研究旨在探究溴虫腈和毒死蜱亚致死浓度处理对等钳蠊螨 *Blattisocius dentriticus* 生长繁殖及解毒酶活性和基因表达量的影响。【方法】利用药膜法处理 2 – 3 日龄等钳蠊螨成螨 24 h,测定溴虫腈和毒死蜱的亚致死剂量;测定和比较 LC_{10} 和 LC_{30} 剂量这两种药剂处理后 F_0 和 F_1 代的产卵量、产卵期、卵孵化率和雌成螨寿命等生物学特性的变化;通过酶活力分析和 RT-PCR 分别测定 LC_{10}, LC_{30} 和 LC_{50} 剂量下这两种药剂处理后钳蠊螨成螨体内谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)、羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)酶活力及其基因表达量变化。【结果】溴虫腈和毒死蜱处理 24 h 对等钳蠊螨成螨的 LC_{50} 分别为 42.56 mg/L 和 72.42 mg/L。溴虫腈和毒死蜱 LC_{10} 和 LC_{30} 剂量处理等钳蠊螨雌成螨后,与对照(清水处理)相比,仅 F_0 代雌成螨寿命和产卵期显著缩短($P<0.05$),而产卵量和卵孵化率无明显变化。酶活力测定结果发现,GST, CYP450 和 CarE 的活力在溴虫腈和毒死蜱 LC_{10} 和 LC_{30} 剂量处理后无明显变化,而 LC_{50} 剂量下,上述 3 种酶的活力均显著增加($P<0.05$)。基因表达结果表明,溴虫腈 LC_{10}, LC_{30} 和 LC_{50} 剂量处理下 2 个 GST 基因(*BdGST*3 和 *BdGST*6)、3 个 CYP450 基因(*BdCYP*2 – 4)和 5 个 CarE 基因(*BdCarE*1 – 5)表达均显著上调;在毒死蜱这 3 个剂量处理下 3 个 GST 基因(*BdGST*1, *BdGST*3 和 *BdGST*4)、3 个 CYP450 基因(*BdCYP*2, *BdCYP*5 和 *BdCYP*6)和 2 个 CarE 基因(*BdCarE*1 和 *BdCarE*2)表达量均显著上调。【结论】结果表明,LC_{10} 和 LC_{30} 剂量的溴虫腈和毒死蜱亚致死剂量会抑制 F_0 代雌成螨的生长繁殖;LC_{10}, LC_{30} 和 LC_{50} 剂量下这两种药剂可诱导等钳蠊螨 GST, CarE 和 CYP450 基因表达;LC_{50} 剂量能明显诱导等钳蠊螨体内 GST, CarE 和 CYP450 活性上升。该研究为等钳蠊螨抗性品系的筛选及田间应用提供了理论依据。

关键词: 等钳蠊螨; 溴虫腈; 毒死蜱; 生长繁殖; 解毒酶; 基因表达量
中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2020)01-0036-10

Effects of sublethal doses of chlorpyrifos and chlorfenapyr on the growth, reproduction and detoxification enzymes of *Blattisocius dentriticus* (Acari: Ascidae)

YANG Juan-Sheng[#], CONG Lin[#], WANG Cui-Lun, HOU Dong-Yuan, ZHOU Hao-Nan, YU Shi-Jiang,

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201508); 中国农业科学院科技创新工程协同创新任务(CAAS-XTCX-2016013); 重庆市科技创新领军人才支持计划(cstc2018kjcxljrc0040); 中央高校基本科研业务费(XDJK2015C014); 西南大学博士基金项目(SWU116061)
作者简介: 杨娟生, 女, 1994 年 2 月生, 云南大理人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: yangjuansheng2017@163.com; 丛林, 女, 1984 年 8 月生, 山东烟台人, 助研, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: conglin@cric.cn
[#]共同第一作者 Authors with equal contribution
[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: ranchun@cric.cn
收稿日期 Received: 2019-09-25; 接受日期 Accepted: 2019-10-29

CHENG Lu-Yan, LEI Shuang, FU Yun-Mei, CHENG Ming-Ming, RAN Chun* (Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China)

Abstract: 【Aim】In integrated pest management, chemical control also presents a certain lethality to natural enemy resources. To alleviate this contradiction, the study aims to investigate the effects of sublethal doses of chlorfenapyr and chlorpyrifos on the growth, reproduction, and detoxification enzyme activity and gene expression in *Blattisocius dentriticus*. 【Methods】The 2 - 3 day-old adults of *B. dentriticus* were treated with chlorfenapyr and chlorpyrifos for 24 h using the residual film method, and the sublethal doses of the two pesticides were determined. The biological characteristics (fecundity, oviposition period, egg hatching rate and longevity of female adult) of F_0 and F_1 generations of female adults exposed to LC_{10} and LC_{30} of the two pesticides were investigated and compared. The changes in the activities of glutathione S-transferase (GST), cytochrome P450 (CYP450) and carboxylesterase (CarE) and the expression levels of their genes in *B. dentriticus* adults treated with LC_{10}, LC_{30} and LC_{50} of the two pesticides were detected using enzyme activity assay and RT-PCR, respectively. 【Results】The LC_{50} values of chlorfenapyr and chlorpyrifos against *B. dentriticus* adults at 24 h were 42.56 mg/L and 72.42 mg/L, respectively. After *B. dentriticus* adults were treated with LC_{10} and LC_{30} of chlorfenapyr and chlorpyrifos, the longevity and oviposition period of F_0 generation of female adults were significantly shortened ($P<0.05$) as compared with those in the control (treatment with water), while the fecundity and egg hatching rate showed no significant change. The activities of GST, CYP450 and CarE of adults stayed stable after the adults were treated with chlorfenapyr and chlorpyrifos at LC_{10} and LC_{30}, but significantly increased when the adults were exposed to the dose of LC_{50} ($P<0.05$). Gene expression profiles revealed that two GST genes (*BdGST*3 and *BdGST*6), three CYP450 genes (*BdCYP*2 - 4), and five CarE genes (*BdCarE*1 - 5) were significantly up-regulated after the adults were treated with chlorfenapyr at the doses of LC_{10}, LC_{30} and LC_{50}, while the expression levels of three GST genes (*BdGST*1, *BdGST*3 and *BdGST*4), three CYP450 genes (*BdCYP*2, *BdCYP*5 and *BdCYP*6) and two CarE genes (*BdCarE*1 and *BdCarE*2) were significantly up-regulated when the adults were treated with chlorpyrifos at the three doses. 【Conclusion】The results show that chlorfenapyr and chlorpyrifos at LC_{10} and LC_{30} inhibit the growth and reproduction of F_0 female mites of *B. dentriticus*, the two pesticides at LC_{10}, LC_{30} and LC_{50} induce the expression of GST, CarE and CYP450 genes, and the activities of GST, CarE and CYP450 in adults exposed to the two pesticides at LC_{50} are significantly increased. This study provides a theoretical basis for screening the resistant strains of *B. dentriticus* and their application in fields.

Key words: *Blattisocius dentriticus*; chlorfenapyr; chlorpyrifos; growth and reproduction; detoxification enzyme; gene expression level

等钳蠊螨 *Blattisocius dentriticus* 属蜱螨亚纲(Acari)囊螨科(Ascidae),为世界性广布种,在欧洲、亚洲、美洲等多个地区均有分布(Hughes, 1976),在我国上海、浙江、广东、辽宁、四川等也有发现(谢少远等, 2000)。潘纪文(1985)发现,等钳蠊螨可在暗处大量捕食腐食酪螨 *Tyrophagus putrescentiae*。Mashaya(2002)则发现该螨对嗜虫书虱 *Liposcelis entomophila* 有一定的捕食效果。郑大睿(2011)进一步研究指出,等钳蠊螨对柑橘全爪螨 *Panonychus citri*、腐食酪螨 *T. putrescentiae* 和茶短须螨 *Brevipalpus obovatus* 具有捕食反应,可作为3种害螨的捕食性天敌。

由于药剂的频繁滥用,导致害螨极易产生抗药性,仅依赖药剂防治已不能从根本解决害螨猖獗问题(Khajehali *et al.*, 2011)。1985年,忻介六引进“以螨治螨”的生防手段并运用在果树上,成功利用捕食螨来防治柑橘害螨(忻介六, 1985)。随着“双减”要求的提出和食品安全关注度的日益提高,捕食螨的大面积推广应用已成为绿色农业发展的热点(徐学农等, 2013; 汝阳等, 2017)。但由于生物防治见效慢、制约因素多等问题,现阶段有害生物综合治理仍需药剂防治的辅助。但药剂的使用,就不可

避免地造成捕食螨的死亡。

为缓解化学防治和生物防治之间的矛盾，Huffaker 和 Kennett (1953) 开发利用了抗药性捕食螨。关注抗药性捕食螨开发的同时，越来越多的学者致力于杀虫剂对昆虫(螨)的亚致死效应的研究(Howe *et al.*, 2015; 全林发等, 2016)。昆虫(螨)在长期的化学农药亚致死剂量的选择压下，可发展和累积昆虫(螨)的抗药性(Young, 2003; 梁炜博等, 2017; Rugno *et al.*, 2019)。溴虫腈和毒死蜱目前是柑橘园应用较广、销量较大的杀虫(螨)剂(钟决龙, 2006; 孙国强和陆贻通, 2007)，目前尚未发现溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨生长繁殖及解毒酶影响的研究。为明确农药亚致死剂量对等钳蠊螨的影响，本研究选用溴虫腈和毒死蜱作为供试药剂，通过生物测定、生物化学和分子生物学等方法，分析比较上述两种药剂对等钳蠊螨的影响，旨在为农药的科学使用及等钳蠊螨的田间推广提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

等钳蠊螨和椭圆食粉螨 *Aleuroglyphus ovatus* 均为实验室饲养种群，且长期不接触药剂。

1.2 供试药剂及主要仪器

10% 溴虫腈(chlorfenapyr)悬浮剂，购自巴斯夫欧洲公司；48% 毒死蜱(chlorpyrifos)乳油，购自美国陶氏益农公司；体视显微镜，购自重庆市奥特光学仪器公司；智能人工气候箱，购自 Percival 公司；酶标仪，购自 Thermo Scientific 公司；定量 PCR 仪，购自 Analytik Jena 公司；酶活性检测试剂盒，购自酶联生物公司；RNA 通用提取试剂盒，购自 OMEGA 公司；反转试剂盒、定量试剂盒，购自 Vazyme 公司。

1.3 室内毒力测定方法

参照 Van Leeuwen 等(2005)的药膜法加以改进(下同)：将两种药剂分别稀释为 6 个浓度梯度(溴虫腈：250.00, 125.00, 83.33, 62.50, 55.56 和 40.00 mg/L；毒死蜱：150.00, 80.00, 75.00, 68.57, 56.47, 53.33 和 46.15 mg/L)，用毛笔蘸取药剂均匀涂抹在六孔凹玻片凹槽内壁(凹槽直径 1.5 cm，深 2.2 mm)，放入通风橱自然晾干。每孔放入充足的椭圆食粉螨，转接 30 头健康的 2–3 日龄等钳蠊螨成螨，盖上盖玻片，用毛笔蘸取清水涂在盖玻片边缘，防止逃逸。将凹玻片置于智能人工气候箱内(温度 25±1℃，相对湿度 75%–85%，光周期 14L∶10D)，24 h 后，在体视镜下检查其死亡率。用毛笔尖轻触螨体，无任何反应者视为死亡。每处理 3 次重复，以清水处理作对照。

1.4 溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨 F_0 代和 F_1 代的亚致死效应

采用药膜法，选用刚蜕皮 6 h 以内的成螨，用溴虫腈和毒死蜱 LC_{10} 和 LC_{30} 剂量处理 24 h 后，挑选一对活泼的雌雄成螨(F_0)至一洁净的凹槽中饲养，定期补充足量椭圆食粉螨。每隔 12 h 观察雌成螨的产卵量和产卵期至其自然死亡；挑取 F_0 代在同一天所产的卵 30 粒于另一干净的凹玻片中，观察其孵化率。挑取 F_0 代同一天产的卵至洁净的凹槽中饲养，在其蜕皮至成螨后，选取雌雄成螨(F_1)各 1 头，进行配对饲养，记录雌成螨寿命、产卵量、产卵期和孵化率，方法同 F_0 代。每剂量 30 个重复，以清水处理作对照。

1.5 等钳蠊螨解毒酶活力测定

方法与螨态选择同 1.4 节，用溴虫腈和毒死蜱 LC_{10}, LC_{30} 和 LC_{50} 剂量处理尽可能多的成螨 24 h 后，收集活泼的成螨至新的离心管中，称重后液氮速冻，置于 –80℃ 超低温冰箱中保存，用于酶活力的测定和 RNA 的提取。每处理 3 个重复，以清水处理作对照。利用酶联免疫分析试剂盒提取、酶标仪测定等钳蠊螨 GST, CYP450 和 CarE 活性。

1.6 RT-PCR

从等钳蠊螨转录组数据库(数据待发表)中筛选出 17 个解毒酶基因，用 DNAMAN 7.0 设计相应的上下游引物(表 1)，利用 RT-PCR 方法，评价其在溴虫腈和毒死蜱亚致死剂量(LC_{10}, LC_{30} 和 LC_{50})胁迫 24 h 后的相对表达量，材料处理方法同 1.5 节。以 *β-actin* 基因作为内参基因(GenBank 登录号：KP310115)(Wang *et al.*, 2018)。PCR 反应体系：2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL，正反向引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, cDNA 1.0 μL, ddH_2O 8.2 μL。PCR 反应程序：95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 57℃ 退火 30 s, 循环 40 次; 95℃ 延伸 15 s。以清水处理作对照。用 7500 Software v2.0.6 分析软件分析和处理数据，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算基因的相对表达量(Pfaffl, 2001)。

1.7 数据处理

采用农药室内生物测定数据处理系统(武汉市蔬菜科学研究所和农业部农药检定所, 2006)计算致死中浓度等毒力参数；利用 SPSS 20.0 软件，对各处理组间的数据进行方差显著性分析(ANOVA, Duncan 氏多重比较, $P<0.05$)(Huizingh, 2012)。

2　结果

2.1　溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨成螨的亚致死剂量

溴虫腈对等钳蠊螨成螨的亚致死剂量 LC_{50}，LC_{30}，LC_{20} 和 LC_{10} 分别为 42.56，23.11，15.97 和 9.57 mg/L，毒死蜱对等钳蠊螨成螨的亚致死剂量 LC_{50}，LC_{30}，LC_{20} 和 LC_{10} 分别为 72.42，49.92，39.86 和 29.17 mg/L（表 2）。

表 1　RT-PCR 所用引物

Table 1　Primers used in RT-PCR

基因 Gene	引物序列（5′-3′） Primer sequences	基因 ID Gene ID
β-actin	TACGACCAGAAGCGTACAGC CCAACCGTGAAAAGATGACC	-
*BdGST*1	CGGCACCTGGTAGTATTTGG ATCTCGGCGGCATTATGA	c42327. graph_c7
*BdGST*2	AGTTTCTGTGCCTCGTGAGC ATGTGGCGAATGGTTTGC	c26010. graph_c0
*BdGST*3	GAACTTTGATTGAGTCGTGCC CATTCCGCCATTTGTTGTC	c24964. graph_c0
*BdGST*4	GGAAGCATTTCTTGGAGACAAC TTCGTCCCACTTAGGAACACTC	c31689. graph_c0
*BdGST*5	CCTTCGGTTTGGATTTCCC ACGACGCTTCTCTTCACACG	c25173. graph_c0
*BdGST*6	GGCGTTCTTTAGGTCACAAGC GCCATTCTGAGGTATCTCGG	c18544. graph_c0
*BdCarE*1	GCAAGGGAAGCATCTGAGAG CGTTGAAGCAATACCACCC	c43464. graph_c0
*BdCarE*2	TTGTCGGAGTTGCTCTTGC CGCCTTACCGTCATTTGTG	c34346. graph_c0
*BdCarE*3	GGCAAACCGCATCATTATG CCAGCCTATTCAACAGCAATC	c43658. graph_c0
*BdCarE*4	GGACAAGAAATGCTCAAGTGC GCTGGAATGTGAACAACGG	c20115. graph_c0
*BdCarE*5	GGGTAGCATCAGATTTGGCA TCATTTCTCGCCGTTCTTG	c37955. graph_c0
*BdCYP*1	AAACCGTCGCCTTCTTCAC CGTTGGCACAAACAGTATGG	c41788. graph_c2
*BdCYP*2	TCGGAATGAGGTTCGCTCT GCACCAGTTTAGCCTTTACGG	c41628. graph_c0
*BdCYP*3	GAATCTATCTCCAACAGCCTGG CACTATCTCATCGTCAAGTCGG	c42769. graph_c0
*BdCYP*4	CGTGGTCATTTCAAGCGTG ATCAAGAACGGAACTGCGG	c41782. graph_c0
*BdCYP*5	TAAATCAGTCGCCGTCACG TCAAATACAGCCTCGTTCCTTC	c44026. graph_c0
*BdCYP*6	AACTTCGGGATGAACGGTC CAGCGGAACTCCAGACATACTC	c40529. graph_c0

表 2　溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨成螨的室内毒力测定结果

Table 2　Toxicity of chlorfenapyr and chlorpyrifos to *Blattisocius dentriticus* adults

农药 Pesticides	斜率 ± 标准差 Slope ± *SD*	LC_{50}（95 % 置信区间）（95% C. L.）（mg/L）	LC_{30}（mg/L）	LC_{20}（mg/L）	LC_{10}（mg/L）	相关系数 R^2
溴虫腈 Chlorfenapyr	1.98 ± 0.05	42.56（34.83 - 51.99）	23.11	15.97	9.57	0.94
毒死蜱 Chlorpyrifos	3.20 ± 0.52	72.42（67.46 - 77.74）	49.92	39.86	29.17	0.90

C. L.：置信区间 Confidential limit.

2.2 溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨的亚致死效应

由表 3 和表 4 可知，溴虫腈 LC_{10} 和 LC_{30} 剂量处理等钳蠊螨 24 h 后，F_0 代雌成螨寿命分别为 20.95 和 21.33 d，较对照（清水处理）明显缩短；LC_{30} 剂量下产卵期仅为 5.53 d，明显短于对照（$P<0.05$）；在毒死蜱处理后 F_0 代雌成螨寿命和产卵期均明显缩短，LC_{30} 剂量下总产卵量明显少于对照（$P<0.05$）；而 LC_{10} 下则差异不显著（$P>0.05$）。两种药剂处理对卵孵化率无明显影响。两种药剂对 F_1 代的总产卵量、产卵期、卵孵化率和寿命均无明显影响（$P>0.05$）。

表 3 亚致死剂量溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨 F_0 代雌成螨寿命及产卵特性的影响

Table 3 Effects of sublethal doses of chlorfenapyr and chlorpyrifos on longevity and reproductive characteristics of female adults of F_0 generation of *Blattisocius dentriticus*

药剂 Pesticides	浓度 Concentration	总产卵量（粒/雌） Fecundity (number of eggs laid per female)	产卵期（d） Oviposition period	卵孵化率（%） Egg hatching rate	雌成螨寿命（d） Longevity of female adult
–	0 (CK)	10.03 ± 0.57 a	7.70 ± 0.09 a	96.67 ± 0.25 a	22.50 ± 1.28 a
溴虫腈	LC_{10}	9.80 ± 0.80 a	6.68 ± 0.65 ab	95.83 ± 0.55 a	20.95 ± 0.93 b
Chlorfenapyr	LC_{30}	9.33 ± 0.73 a	5.53 ± 0.93 b	94.17 ± 0.52 a	21.33 ± 0.76 b
毒死蜱	LC_{10}	9.50 ± 0.54 a	6.34 ± 0.76 b	95.00 ± 0.69 a	20.48 ± 0.72 b
Chlorpyrifos	LC_{30}	6.91 ± 0.69 b	5.20 ± 0.65 b	94.25 ± 0.35 a	19.58 ± 0.68 b

CK：清水处理，作空白对照 Treatment with water as the blank control. 表中数据为平均值 ± 标准差；同列数据后不同的小写字母代表差异显著（$P<0.05$，Duncan 氏多重检验）。Data in the table are mean ± *SD*, and the lowercase letters following the data in the same column represent significant differences ($P<0.05$, Duncan's multiple range test). 表 3 和 4 同 The same for Tables 3 and 4.

表 4 亚致死剂量溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨 F_1 代雌成螨寿命及产卵特性的影响

Table 4 Effects of sublethal doses of chlorfenapyr and chlorpyrifos on longevity and reproductive characteristics of female adults of F_1 generation of *Blattisocius dentriticus*

药剂 Pesticides	浓度 Concentration	总产卵量（粒/雌） Fecundity (number of eggs laid per female)	产卵期（d） Oviposition period	卵孵化率（%） Egg hatching rate	雌成螨寿命（d） Longevity of female adult
–	0 (CK)	10.03 ± 0.57 ab	7.70 ± 0.87 ab	96.67 ± 0.25 a	22.50 ± 1.28 a
溴虫腈	LC_{10}	9.29 ± 0.99 ab	6.90 ± 0.98 ab	97.75 ± 0.38 a	23.13 ± 1.08 a
Chlorfenapyr	LC_{30}	8.33 ± 0.63 b	6.20 ± 1.05 b	93.33 ± 0.50 a	22.48 ± 1.29 a
毒死蜱	LC_{10}	11.38 ± 0.64 a	8.35 ± 0.62 a	95.83 ± 0.29 a	23.26 ± 1.14 a
Chlorpyrifos	LC_{30}	11.58 ± 0.96 a	8.37 ± 1.10 a	95.00 ± 0.25 a	23.15 ± 1.13 a

2.3 亚致死剂量溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨解毒酶活性影响

由表 5 可知，溴虫腈和毒死蜱 LC_{10}，LC_{30} 和 LC_{50} 剂量处理等钳蠊螨 24 h 后，GST，CYP450 和 CarE 3 种酶活力均有不同程度的上升。其中，溴虫腈 LC_{50} 剂量下，3 种酶活力分别为 752.80，1 375.59 和 198.70 mIU/L，显著高于对照（$P<0.05$）；而其余剂量下则无明显差异（$P>0.05$）。同样，在毒死蜱 LC_{50} 剂量下，3 种酶活力均显著高于对照（$P<0.05$）；但 LC_{30} 剂量下，CYP450 酶活力 1 291.85 mIU/L，显著高于对照（$P<0.05$）；其余处理下 3 种酶活力差异不明显（$P>0.05$）。

表 5 亚致死剂量溴虫腈和毒死蜱对等钳蠊螨成虫 GST，CYP450 和 CarE 酶活性的影响

Table 5 Effects of sublethal doses of chlorfenapyr and chlorpyrifos on activities of GST, CYP450 and CarE in *Blattisocius dentriticus* adults

药剂 Pesticides	浓度 Concentration	GST 活力（mIU/L） GST activity	CYP450 活力（mIU/L） CYP450 activity	CarE 活力（mIU/L） CarE activity
–	0 (CK)	656.55 ± 42.79 b	1 187.68 ± 58.39 cd	172.35 ± 5.72 b
溴虫腈 Chlorfenapyr	LC_{10}	712.42 ± 22.19 ab	1 071.23 ± 16.57 d	183.22 ± 2.95 ab
	LC_{30}	746.09 ± 7.98 ab	1 246.53 ± 45.95 bc	190.04 ± 5.41 ab
	LC_{50}	752.80 ± 12.91 a	1 375.59 ± 14.23 ab	198.70 ± 5.52 a
毒死蜱 Chlorpyrifos	LC_{10}	657.20 ± 4.48 b	1 197.36 ± 68.35 cd	173.26 ± 0.86 b
	LC_{30}	692.30 ± 24.18 ab	1 291.85 ± 53.45 bc	175.02 ± 3.84 b
	LC_{50}	751.82 ± 11.98 a	1 495.91 ± 8.87 a	196.43 ± 9.77 a

2.4 亚致死剂量溴虫腈和毒死蜱胁迫对等钳蠊螨体内解毒酶基因表达的影响

2.4.1 对 GST 基因表达的影响：由图 1(A)可知，溴虫腈处理下，随着剂量增加，等钳蠊螨 *BdGST*3 和 *BdGST*6 表达量均显著高于对照($P<0.05$)；在 LC_{10} 和 LC_{30} 剂量下其余 GST 基因表达量差异不明显($P>0.05$)，但 LC_{50} 剂量下较对照明显增加($P<0.05$)。由图 1(B)可知，在毒死蜱 LC_{10}，LC_{30} 和 LC_{50} 3 个剂量下，等钳蠊螨 *BdGST*1，*BdGST*3 和 *BdGST*4 基因表达量均明显高于对照($P<0.05$)；*BdGST*2 和 *BdGST*6 基因在 LC_{10} 剂量下表达量无明显变化($P>0.05$)，但 LC_{30} 和 LC_{50} 剂量下较对照明显增加($P<0.05$)；*BdGST*5 基因在 LC_{10} 和 LC_{30} 剂量下表达量变化不明显($P>0.05$)，而 LC_{50} 剂量下相对表达量高达 5.76，明显高于对照($P<0.05$)。

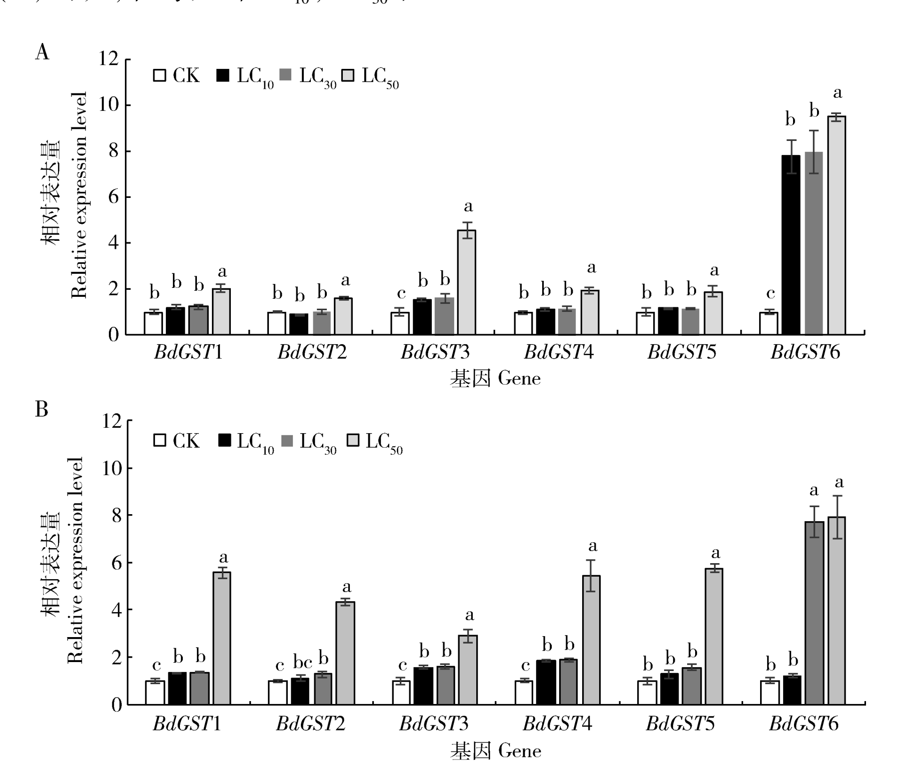


图 1　亚致死剂量溴虫腈(A)和毒死蜱(B)处理下等钳蠊螨成虫 GST 基因相对表达量

Fig. 1　Relative expression levels of GST genes in *Blattisocius dentriticus* adults exposed to sublethal doses of chlorfenapyr (A) and chlorpyrifos (B)

CK：清水处理，作空白对照 Treatment with water as the blank control. 基因相对表达量变化倍数(以对照为基准)以平均值 ± 标准误表示；同一基因的各浓度下基因表达量用不同的小写字母代表差异显著($P<0.05$，Duncan 氏多重检验)；图 2 和 3 同。The folds of relative expression level (normalized to that in the control) are presented as mean ± *SE*, and different lowercase letters above bars represent significant difference in the expression level of the same gene among different doses ($P<0.05$, Duncan's multiple range test). The same for Figs. 2 and 3.

2.4.2 对 CYP450 基因表达的影响：在溴虫腈和毒死蜱 3 个剂量胁迫下，等钳蠊螨 CYP450 基因表达情况如图 2 所示。在溴虫腈 3 个剂量胁迫下，*BdCYP*1 基因表达量较对照明显下调($P<0.05$)；*BdCYP*2，*BdCYP*3 和 *BdCYP*4 基因表达量随浓度变化均显著上调($P<0.05$)；在 LC_{10} 和 LC_{30} 剂量下 *BdCYP*5 和 *BdCYP*6 表达量无明显变化($P>0.05$)，但 LC_{50} 剂量下上调明显($P<0.05$)(图 2：A)。毒死蜱 3 个剂量胁迫下，*BdCYP*2，*BdCYP*5 和 *BdCYP*6 基因表达量较对照明显上调($P<0.05$)；*BdCYP*4 基因无明显变化($P>0.05$)；*BdCYP*1 和 *BdCYP*4 基因在 LC_{10} 剂量下表达量略有下调，但无明显差异($P>0.05$)；*BdCYP*4 基因表达量在 LC_{30} 和 LC_{50} 剂量下无明显变化($P>0.05$)，而 *BdCYP*1 基因表达量则在 LC_{50} 剂量下明显上调($P<0.05$)(图 2：B)。

2.4.3 对 CarE 基因表达的影响：溴虫腈和毒死蜱 LC_{10}，LC_{30} 和 LC_{50} 剂量处理后 5 个脂酶基因表达情况如图 3 所示，溴虫腈处理下 *BdCarE*1，*BdCarE*4 和 *BdCarE*5 基因表达量随浓度的增加均显著上调($P<0.05$)；*BdCarE*2 和 *BdCarE*3 基因表达量均高于对照，在 LC_{10} 剂量下分别为对照的 6.97 和 5.62 倍，但在 LC_{30} 剂量开始却出现下调现象($P<0.05$)

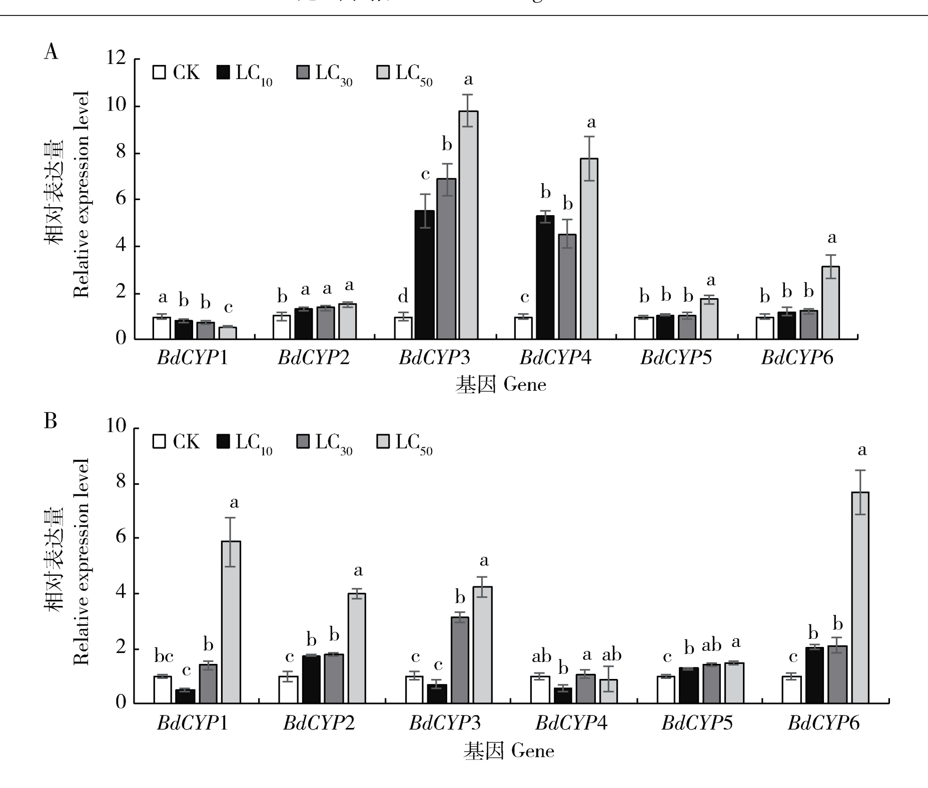


图 2 亚致死剂量溴虫腈(A)和毒死蜱(B)处理下等钳蠊螨成虫 CYP450 基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of CYP450 genes in *Blattisocius dentriticus* adults exposed to sublethal doses of chlorfenapyr (A) and chlorpyrifos (B)

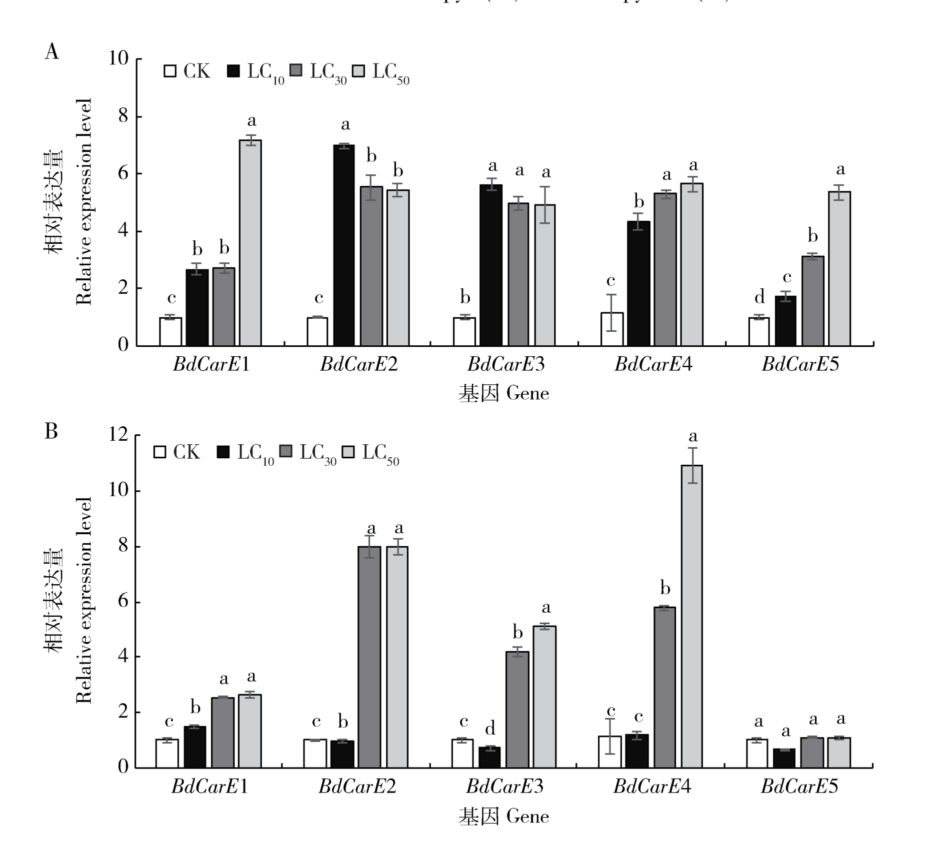


图 3 亚致死剂量溴虫腈(A)和毒死蜱(B)处理下等钳蠊螨成虫 CarE 基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of CarE genes in *Blattisocius dentriticus* adults exposed to sublethal doses of chlorfenapyr (A) and chlorpyrifos (B)

(图 3：A)。毒死蜱处理下 *BdCarE*1 基因表达量随浓度增加明显上调($P<0.05$)；LC_{10}处理下 *BdCarE*4 基因表达量与对照相比差异不明显($P>0.05$)，而在 LC_{30}和 LC_{50} 剂量处理下表达均显著上调($P<0.05$)；*BdCarE*5 基因表达量与对照相比无明显差异($P>0.05$)(图 3：B)。

3　讨论

农药亚致死效应可导致昆虫(螨)的生长发育、繁殖等特性的改变(Delpuech *et al.*, 1998)。例如，在二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 的研究中发现，溴虫腈亚致死剂量处理后，其 F_0 代的寿命和产卵期出现缩短的现象(Sani Bozhgani *et al.*, 2018)。家蚕幼虫经溴虫腈处理后，其 F_0 代生长发育未受影响，但其茧层量却显著升高(罗雁婕等, 2011)。而利用毒死蜱 LC_{10}和 LC_{25}处理褐飞虱 3 龄若虫后，其 F_0 代和 F_1 代卵孵化率显著降低。在对柑橘全爪螨的研究中也发现，利用甲氰菊酯亚致死剂量处理其若螨后，当代雌成螨(F_0 代)产卵量增加，其后代 F_1 代和 F_2 代产卵前期缩短，后代雌雄性比增大；而阿维菌素处理却导致 F_0-F_2 代产卵量显著降低(何恒果等, 2016)。本研究也证实，溴虫腈和毒死蜱亚致死剂量处理后会导致等钳蠊螨 F_0 代雌成螨寿命和产卵期缩短，对 F_1 代的寿命及产卵等生物学特性无明显影响。由此可见，溴虫腈和毒死蜱亚致死剂量短期会降低该螨的繁殖速度和防治效果，但对下一代生长繁殖无影响，不会大幅影响其种群数量变化。文中溴虫腈的亚致死剂量值由于试验浓度设置偏高可能有偏差，但对后续评价无明显影响，可为等钳蠊螨抗性筛选及科学应用提供理论依据。

亚致死效应不仅对昆虫(螨)的生物学特性会有影响，也会对其体内多种解毒代谢酶产生诱导或抑制作用(尹显慧等, 2008；张文成等, 2009)。在韭菜迟眼蕈蚊 *Bradshaw odoriphaga* 4 龄幼虫研究中发现，经溴虫腈 LC_{10}，LC_{20}和 LC_{50}处理后，其 GST，CarE 和 O-demethylation 活性显著上升(Zhao *et al.*, 2018)，说明溴虫腈亚致死剂量可诱导这 3 种酶的活性。在二斑叶螨经阿维菌素 LC_{10}和 LC_{20}处理 24 h 后，其 GST，MFO 和 CarE 活力均显著高于对照(汝阳等, 2017)。认为这 3 种酶在巴氏新小绥螨体内均被诱导。不同药剂胁迫对昆虫体内相关代谢酶影响不尽相同。用噻虫胺 LC_{15}和 LC_{30}处理桃蚜 *Myzus persicae* 24 h 后，CarE 活力较对照分别上升 1.29 和 1.36 倍，而 GST 的活力则被抑制(抑制率分别为 11.9% 和 22.7%)(任学祥等, 2017)。在本研究中，溴虫腈和毒死蜱 LC_{50}剂量处理 24 h 后等钳蠊螨 GST，P450 和 CarE 活性均高于对照，在 LC_{30}剂量下 P450 酶活力分别为 1 246.53 和 1 291.85 mIU/L，较对照明显上升($P<0.05$)(表 5)。表明 3 种酶活力在受到药剂胁迫时明显被诱导，GST，P450 和 CarE 可能是等钳蠊螨体内代谢或水解溴虫腈和毒死蜱的重要酶系。

在基因表达量的研究中也证实，药剂亚致死剂量还会影响昆虫(螨)体内基因表达。在二化螟 *Chilo suppressalis* 的研究中发现，经氯虫苯甲酰胺亚致死剂量处理其 5 龄幼虫后，*CsGSTd*1，*CsGSTd*2 和 *CsGSTt*1 等 10 个 GST 基因表达明显上调，表明这些基因可能参与了其对氯虫苯甲酰胺的解毒代谢(金燕璐等, 2018)。在巴氏新小绥螨的研究中也有发现，经阿维菌素 LC_{10}和 LC_{30}处理常温品系后，发现其 *GST*3，*GST*4，*CYP*1，*CYP*2，*CarE*1 和 *CarE*2 基因可能参与了其对阿维菌素的解毒代谢(胡琴, 2017)。而 *CYP4G62*，*CYP6EL1* 和 *CYP9AQ1* 则可能在飞蝗对马拉硫磷的解毒代谢过程中发挥重要作用(于荣荣等, 2012)。本实验对 17 个等钳蠊螨基因在溴虫腈和毒死蜱胁迫 24 h 后的 mRNA 表达水平进行了相对定量分析，发现溴虫腈处理后 *BdGST*3，*BdGST*6，*BdCYP*3 和 *BdCYP*4 以及 5 个 CarE 基因(*BdCarE*1 –5)表达量均显著上调($P<0.05$)，毒死蜱处理后 *BdGST*1，*BdGST*3，*BdGST*4，*BdCYP*2，*BdCYP*3，*BdCYP*4，*BdCarE*1 和 *BdCarE*3 基因表达明显上调($P<0.05$)(图 1 –3)。研究结果表明，溴虫腈和毒死蜱亚致死剂量同时诱导了等钳蠊螨多个解毒或代谢抗性基因表达上调，由此推断，等钳蠊螨对溴虫腈和毒死蜱的抗性可能是一个复杂的过程，可能与多种基因表达上调有关。研究结果为进一步研究等钳蠊螨对溴虫腈和毒死蜱的抗性机制提供了思路。

参考文献(References)

Delpuech JM, Gareau E, Terrier O, Fouillet P, 1998. Sublethal effects of the insecticide chlorpyrifos on the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae*. *Chemosphere*, 36(8)：1775 –1785.

He HG, Yan XX, Wang JJ, Zhao ZM, 2016. Sublethal effects of fenpropathrin and avermectin on *Panonychus citri* (Acari: Tereanychidae). *Chin. J. Appl. Ecol.*, 27(8)：2629 –2635. [何恒果, 闫香慧, 王进军, 赵志模, 2016. 甲氰菊酯和阿维菌素对柑橘全爪螨的亚致死效应. 应用生态学报, 27(8)：2629 –

2635]

Howe A, Ransijn J, Pavn H, 2015. A sublethal effect on native *Anthocoris nemoralis*, through competitive interactions with invasive *Harmonia axyridis*. *Ecol. Entomol.*, 40(5): 639-649.

Hu Q, 2017. Study on Sublethal Dose of Avermectin to the Different Thermal Strains of Experimental Group of *Neoseiulus barkeri* (Acari: Phytoseiidae). MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. 43-56. [胡琴, 2017. 阿维菌素亚致死剂量对巴氏新小绥螨不同温度品系实验种群影响研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文. 43-56]

Huffaker CB, Kennett CE, 1953. Differential tolerance to parathion of two *Typhlodromus* predatory on cyclamen mite. *J. Econ. Entomol.*, 46(4): 707-708.

Hughes AM, 1976. The Mites of Stored Food and Houses. Her Majesty's Stationery Office, London. 9: 324-333.

Huizingh E, 2012. Inleiding SPSS 20.0 voor IBM SPSS Statistics. Academic Service, Sdu Uitgevers BV. 77-105.

Jin YL, Zhang BX, Lin HF, 2018. Identifying and measuring the expression profiles, of *Chilo suppressalis* glutathione-*S*-transferase genes. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 55(3): 349-359. [金燕璐, 张邦贤, 林华峰, 2018. 二化螟谷胱甘肽-*S*-转移酶基因的鉴定与表达模式分析. 应用昆虫学报, 55(3): 349-359]

Khajehali J, Van Nieuwenhuyse P, Demaeght P, Tirry L, Van Leeuwen T, 2011. Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands. *Pest Manag. Sci.*, 67(11): 1424-1433.

Liang WB, Xiang X, Wang XG, Yang QF, Luo JD, 2017. Effects of sublethal doses of thiacloprid on the detoxifying enzyme activities and the growth and reproduction of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(10): 1187-1197. [梁炜博, 向兴, 王学贵, 杨群芳, 罗家栋, 2017. 噻虫啉亚致死剂量对斜纹夜蛾解毒酶系活性与生长繁殖的影响. 昆虫学报, 60(10): 1187-1197]

Luo YJ, Xie DY, Chai JP, Liu YG, Huang P, Ding W, 2011. Toxicity and effect of sublethal dosage of several common pesticides to growth and development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Sci. Seric.*, 37(1): 142-146. [罗雁婕, 谢道燕, 柴建萍, 刘永光, 黄平, 丁伟, 2011. 几种常用杀虫剂对家蚕的毒力及亚致死剂量对家蚕生长发育的影响. 蚕业科学, 37(1): 142-146]

Mashaya N, 2002. Predation of the booklouse *Liposcelis entomophila* (Enderlein) by *Blattisocius dentriticus* (Berlese) and their susceptibility to deltamethrin and fenitrothion. *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 22(1): 75-79.

Pan JW, 1985. Gingival and kelp found in the cured meat warehouse. *Entomol. Knowl.*, 22(6): 263-264. [潘纪文, 1985. 腌腊肉仓库中发现齿蠊螨和基氏蠊螨. 昆虫知识, 22(6): 26-27]

Pfaffl M, 2001. A new mathematical model for relative quantification in teal-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29 (9): e45.

Quan LF, Zhang HJ, Sun LN, Li YY, Yan WT, Yue Q, Qiu GS, 2016. Research advances in sublethal effect of pesticide. *J. Agric.*, 6(5): 33-38. [仝林发, 张怀江, 孙丽娜, 李艳艳, 闫文涛, 岳强, 仇贵生, 2016. 杀虫剂对害虫的亚致死效应研究进展. 农学学报, 6(5): 33-38]

Ren XX, Wang G, Zuo YM, Wang KY, Wang J, 2011. The toxicity and effects of sublethal doses on detoxifying enzymes of clothianidin to *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Acta Entomol. Sin.*, 54(3): 299-305. [任学祥, 王刚, 左一鸣, 王开运, 王杰, 2011. 噻虫胺对桃蚜的毒力及其亚致死剂量对桃蚜解毒酶系活力的影响. 昆虫学报, 54(3): 299-305]

Ru Y, Chen YN, Shang SQ, Zhang XH, 2017. Effect of sublethal dose of avermectin on the activities of detoxifying enzymes in *Tetranychus urticae*. *J. Gansu Agric. Univ.*, 52(1): 87-91. [汝阳, 陈耀年, 尚素琴, 张新虎, 2017. 阿维菌素亚致死剂量对二斑叶螨解毒酶系的影响. 甘肃农业大学学报, 52(1): 87-91]

Rugno GR, Zanardi OZ, Parra JRP, Yamamoto PT, 2019. Lethal and sublethal toxicity of insecticides to the lacewing *Ceraeochrysa cubana*. *Neotrop. Entomol.*, 48(1): 162-170.

Sani Bozhgani NS, Ghobadi H, Riahi E, 2018. Sublethal effects of chlorfenapyr on the life table parameters of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Syst. Appl. Acarol.*, 23(7): 1342-1351.

Sun GQ, Lu YT, 2007. Mechanism, application and developmental future of chlorfenapyr. *Anhui Agric. Sci. Bull.*, 13(7): 69-71. [孙国强, 陆贻通, 2007. 溴虫腈农药的作用机理、应用及开发前景. 安徽农学通报, 13(7): 69-71]

Van Leeuwen T, Van Steven P, Luc T, 2005. Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranyc husurticae*. *Pest Manag. Sci.*, 61(5): 499-507.

Wang ZH, Gong YJ, Chen JC, Su XC, Cao LJ, Hoffmannb AA, Wei SJ, 2018. Laboratory selection for resistance to sulfoxaflor and fitness costs in the green peach aphid *Myzus persicae*. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 21(1): 408-412.

Xie SY, Wen X, Chen KS, Wu ZW, Mo SJ, Li XQ, 2000. Four new records of the stored product mite species in China. *Grain Storage*, (5): 17-19. [谢少远, 文新, 陈开生, 吴泽文, 莫少坚, 李小青, 2000. 中国储藏物螨类4种新记录. 粮食储藏, (5): 17-19]

Xin JL, 1985. Current status and perspectives in mites as biological control agents of insect pests. *Chin. J. Biol. Control*, 1(1): 40-43. [忻介六, 1985. 螨类作为害虫生物防治作用物的现况及其前景. 生物防治通报, 1(1): 40-43]

Xu XN, Lv JL, Wang ED, 2013. Hot spots in international predatory mite studies and lessons to us. *Chin. J. Biol. Control*, 29(2): 163-174. [徐学农, 吕佳乐, 王恩东, 2013. 国际捕食螨研发与应用的热点问题及启示. 中国生物防治学报, 29(2): 163-174]

Yin XH, Wu QJ, Li XF, Zhang YJ, Xu BY, 2008. Effect of sublethal concentrations of spinosad on the activities of detoxifying enzymes in the larvae of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Chin. J. Pestic. Sci.*, 10(1): 28-34. [尹显慧, 吴青君, 李学锋, 张友军, 徐宝云, 2008. 多杀菌素亚致死浓度对小菜蛾解毒酶系活力的影响. 农药学学报, 10(1): 28-34]

Young HP, Bailey WD, Roe RM, 2003. Spinosad selection of a

laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), and characterization of resistance. *Crop Prot*., 22(2): 265 - 273.

Yu RR, Guo YQ, Zhang JZ, Ma EB, Guo YP, 2012. Effect of sublethal doses of malathion and carbaryl on the P450 genes of *Locusta migratoria*. *Chin. J. Appl. Entomol*., 49(3): 693 - 699. [于荣荣, 郭艳琼, 张建珍, 马恩波, 郭亚平, 2012. 亚致死剂量马拉硫磷和西维因对飞蝗 P450 基因表达研究. 应用昆虫学报, 49(3): 693 - 699]

Zhang WC, Wang KY, Niu F, Wang D, Ren XX, 2009. Induction of chlorfenapyr on endogenous protective and detoxifying enzymes in bee tarmyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *J. Plant Prot*., 36(5): 455 - 460. [张文成, 王开运, 牛芳, 王东, 任学祥, 2009. 虫螨腈胁迫对甜菜夜蛾保护酶系和解毒酶系的诱导效应. 植物保护学报, 36(5): 455 - 460]

Zhao Y, Wang Q, Ding J, Wang Y, Zhang ZQ, Liu F, Mu W, 2018. Sublethal effect of chlorfenapyr on the life table parameters, nutritional physiology and enzymatic properties of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *Pestic. Biochem. Physiol*., 148: 93 - 102.

Zheng DR, 2011. Studies on Biology and Ecology of *Blattisocius dentriticus* (Berlese) and Its Application. PhD Dissertation, Sun Yat-sen University, Guangzhou. 81 - 128. [郑大睿, 2011. 等钳蠊螨的生物学、生态学及其应用研究. 广州: 中山大学博士学位论文. 81 - 128]

Zhong JL, 2006. Application status and prospects of domestic chlorpyrifos. *Pestic. Market News*, (19): 11 - 12. [钟决龙, 2006. 国内毒死蜱应用现状及前景展望. 农药市场信息, (19): 11 - 12]

（责任编辑：赵利辉）